

10 / 502359
PCT 03 / 00038

23 JUL 2004



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

REC'D 20 MAR 2003

WIPO PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200200158, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 24 de Enero de 2002.

Madrid, 25 de febrero de 2003

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

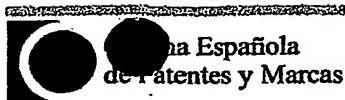
M. MADRUGA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



España
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

102 ENE 24 12:40

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

Consejo Sup. Investig. Científicas

NOMBRE

NACIONALIDAD

Española

CÓDIGO PAÍS

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO Serrano, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

ENJUÁNES SÁNCHEZ
ESCORS MURUGARREN
ORTEGO ALONSO

NOMBRE

LUIS
DAVID
JAVIER

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

CÓDIGO

PAÍS
ES
ES
ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

SECUENCIA DE ÁCIDO NÚCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y SUS APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☒

(15) AGENTE / REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENAR, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

Domingo Represa Sánchez, calle Serrano, 113 - 28006 MADRID

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 23

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 18

☒ DIBUJOS, Nº DE PÁGINAS: 13

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 1

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Domingo Represa
(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oeppm.es

www.oeppm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA

Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200200158

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y SUS APLICACIONES

La secuencia de ácido nucleico comprende la señal de encapsidación del RNA de un coronavirus del grupo 1, tal como el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), situada entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma de dicho coronavirus. Dicha secuencia puede utilizarse para construir vectores virales útiles en investigación básica y aplicada, por ejemplo, en el desarrollo de sistemas de expresión de productos de interés, vectores vacunales y terapia génica.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

24 NÚMERO DE SOLICITUD
P20 0200158

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

71 SOLICITANTE (S)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DOMICILIO Serrano, 117 - 28006 MADRID

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

72 INVENTOR (ES) Luis Enjuanes Sánchez, David Escors Murugarren y Javier Ortego Alonso

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE
ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y
SUS APLICACIONES

57 RESUMEN

SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN
CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y SUS APLICACIONES

La secuencia de ácido nucleico comprende la señal de encapsidación del RNA de un coronavirus del grupo 1, tal como el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), situada entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma de dicho coronavirus. Dicha secuencia puede utilizarse para construir vectores virales útiles en investigación básica y aplicada, por ejemplo, en el desarrollo de sistemas de expresión de productos de interés, vectores vacunales y terapia génica.

SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO QUE COMPRENDE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DEL RNA DE UN CORONAVIRUS DEL GRUPO 1 Y SUS APLICACIONES

5

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La invención se relaciona con una secuencia de ácido nucleico que comprende la señal de encapsidación (SE) del RNA de un coronavirus del grupo 1 y su empleo en la construcción de vectores útiles en virología y sanidad.

— Los virus con genoma RNA (virus RNA) son fuentes potenciales de vectores virales útiles para fines vacunales o de terapia génica. Este tipo de aplicaciones requiere que los vectores virales sean bioseguros. Aunque los vectores virales derivados de virus RNA son bastante seguros, no puede descartarse la posibilidad de que recuperen su virulencia por recombinación con virus circulantes, lo que limita considerablemente sus posibilidades de uso tanto en investigación básica como en investigación aplicada. Por este motivo, existe la necesidad de desarrollar vectores virales derivados de virus RNA con elevada bioseguridad.

Entre los vectores virales derivados de virus RNA potencialmente útiles en sanidad humana o animal se encuentran los vectores virales derivados de coronavirus (solicitud de patente española P9902673). Los coronavirus son virus ssRNA(+) que presentan el genoma más grande conocido para un virus RNA, con una longitud comprendida entre 27,6 y 31 kilobases (kb). El genoma de los coronavirus comprende una secuencia de nucleótidos implicada en la encapsidación del genoma en los viriones, en adelante secuencia o señal de encapsidación (SE). La ausencia o alteración de dicha SE provoca una encapsidación reducida o nula del genoma en los viriones lo que puede resultar interesante para determinadas aplicaciones.

Aunque se ha caracterizado una SE de 61 nt en el genoma del coronavirus MHV (virus de la hepatitis murina) localizada en la ORF 1b, 1,4 kilobases (kb) a partir del extremo 3' del gen 1 y una señal homóloga en el genoma del coronavirus bovino (BCoV) (Cologna y Hogue, 2000; Fosmire y cols., 1992; Woo y cols., 1997), existe la necesidad de localizar y caracterizar dichas SE en otros coronavirus potencialmente útiles en diversas aplicaciones, tanto de investigación básica como biomédica, por ejemplo, del coronavirus TGEV (virus de la gastroenteritis porcina transmisible). La localización y caracterización de dicha SE en otros coronavirus permitiría construir nuevos vectores virales derivados de dichos coronavirus, con un nivel de bioseguridad más elevado y ampliar de este modo el arsenal de herramientas disponibles para investigación

básica y aplicada.

Ahora se ha localizado la región del genoma del virus TGEV que comprende la SE de dicho virus lo que ha permitido el desarrollo de nuevos vectores caracterizados por su elevado grado de bioseguridad. El nuevo vector proporcionado por esta invención puede ser utilizado en investigación básica o aplicada, por ejemplo, para obtener productos de interés (proteínas, enzimas, anticuerpos, etc.), como vector vacunal o en terapia génica tanto en humanos como en animales. Este nuevo vector presenta, además de la capacidad de infectar las mucosas entéricas y respiratorias, es decir, los sitios más adecuados para la inducción de inmunidad secretoria y de que su tropismo puede ser controlado mediante la modificación del gen S (spike), la ventaja de que puede construirse con un elevado grado de bioseguridad.

La Figura 1 ilustra la selección de las regiones que potencialmente contienen la señal de encapsidación de TGEV. La barra de la parte superior de la figura representa el minigenoma M33. Sobre la barra del minigenoma se indican las dos regiones del extremo 5' del minigenoma M33 delimitadas por flechas de doble cabeza (regiones A y B). Debajo de las zonas A y B se muestran esquemáticamente las subregiones investigadas. Los números sobre la barra y debajo de ella indican las posiciones del genoma del virus TGEV.

La Figura 2 es un esquema ilustrativo del clonaje de las regiones potencialmente implicadas en la encapsidación en el minigenoma M39-GUS. Este esquema representa al minigenoma M39-GUS con los insertos correspondientes a las regiones definidas en la Figura 1 (Ai o B) clonadas bajo el control de la TRS del minigenoma. Se muestran las secuencias de la TRS, la secuencia conservada 5'-CUAAAC-3', el inserto (Ai o B) y el gen *gus* en azul. Se indica la posición de las secuencias de restricción *SaI* que flanquean a los insertos clonados en el minigenoma. Los números indican las posiciones en el genoma del virus TGEV.

La Figura 3 muestra la estructura del RNA DI-C y de los minigenomas M39 y M33, mutantes de delección de la DI-C. El RNA DI-C está formado por cuatro regiones discontinuas del genoma del virus TGEV (I, n, m y IV). Estas regiones comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la ORF 1b casi completa incluyendo la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el extremo 5' del gen S, la ORF 7 incompleta y la UTR del extremo 3'. A partir del genoma DI-C se obtuvieron mediante delecciones los minigenomas M39 y M33. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma indican los genes virales. Debajo de las barras representando a los minigenomas DI-C, M39 y M33, la longitud de las regiones discontinuas se muestra en nucleótidos. La longitud total de los RNAs se muestra a la derecha del genoma y minigenomas.

La región identificada como 2144 representa la secuencia del genoma desde la posición 1 a la 2.144 de TGEV. La barra clara, ancha, del minigenoma M33 representa a la secuencia entre las posiciones 12.195 y 12.762. Las barras claras y oscuras, estrechas, situadas en el extremo de la derecha, representan la secuencia comprendida entre las posiciones 28.087 y 28.586.

5 La Figura 4 ilustra el rescate y amplificación de los minigenomas M39-GUS-A1, -A2, -A3, -A4 y -8 generados y representa el esquema del procedimiento experimental utilizado, partiendo de células ST transfectadas con los plásmidos e infectadas con el virus TGEV (PO). Para amplificar los minigenomas se pasó el virus generado tres veces consecutivas en células ST
10 confluentes (PI, P2 y P3). En el tercer pase se analizó el RNA viral en la célula y en los viriones purificados.

La Figura 5 pone de manifiesto la detección de los RNAs subgenómicos del virus TGEV mediante RT-PCR en células infectadas y muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de RT-PCR específicas para la detección de cada uno de los RNAs subgenómicos del virus, indicados en la parte superior del gel. Las bandas minoritarias
15 corresponden a productos no identificados de las reacciones de RT-PCR y probablemente corresponden a hibridaciones inespecíficas.

La Figura 6 ilustra el análisis de las preparaciones de virus TGEV purificados mediante tres procedimientos distintos: a) análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata del virus TGEV concentrado por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31%
20 (gel de la izquierda) o b) por centrifugación a través de un gradiente continuo de sacarosa (gel del centro), o c) análisis por electroforesis SDS-PAGE y fluorografía de virus TGEV marcado radiactivamente y purificado por inmunocaptura (gel de la derecha). Las flechas indican las posiciones de las proteínas estructurales mayoritarias. *, proteínas contaminantes.

La Figura 7 ilustra la detección de los mRNAs del virus TGEV por RT-PCR en viriones purificados y muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de RT-PCR obtenidos para la detección de los mRNAs que se indican en la parte superior de los
25 geles, en virus concentrado (A), virus purificado por gradiente de sacarosa (B), virus purificado por inmunocaptura (C) y virus purificado por inmunocaptura con 15 lavados con tampón PES-ESA solo o incluyendo las concentraciones del detergente no iónico Tween-20 que se indican
30 (D).

La Figura 8 ilustra la detección del genoma, minigenoma M39-GUS y mRNA-GUS en células ST, infectadas con un inóculo de virus TGEV que contenía el minigenoma M39-GUS,

y en viriones purificados. La Figura 8A muestra el esquema del minigenoma M39-GUS (barra superior) y del mRNA codificado por éste (barra inferior) detectados por RT-PCR con los oligonucleótidos utilizados indicados sobre cada barra. La secuencia líder se muestra en los extremos 5' (L). A la derecha se indica si los RNAs se replican (REP +) y encapsidan (ENC +).

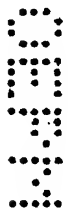
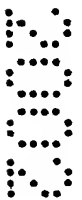
5 La Figura 8B muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de RT-PCR específicas para la detección del genoma (G), minigenoma (Mi) y mRNA-GUS (mRNA). Los tamaños de los productos se muestran a la derecha del gel.

La Figura 9 representa esquemáticamente las secuencias potencialmente implicadas en el rescate eficiente del minigenoma M33. En el esquema mostrado en la Figura 9A se representa el RNA genómico del virus TGEV y el RNA DI-C generado a partir de éste. La estructura del minigenoma M33 se compara con la del RNA del minigenoma DI-C. A, región del extremo 5' del genoma del virus; B, región procedente de la secuencia solapante entre las ORFs la y lab. Cada una de las regiones del minigenoma DI-C está sombreada indicando su procedencia dentro del genoma del virus. La Figura 1B representa esquemáticamente el minigenoma M33 con las regiones A y B señaladas. Las subdivisiones de cada región se esquematizan como barras. Los números indican posiciones del genoma.

La Figura 10 muestra esquemáticamente la inserción de las secuencias del extremo 5' del minigenoma M33 en mRNAs mensajeros derivados del minigenoma M39-GUS. El esquema superior representa el minigenoma M39-GUS en el que se ha insertado un módulo de expresión compuesto por una IRS optimizada, las secuencias insertadas (Ai o B) y el gen *gus*. El esquema inferior representa la transfección de las construcciones generadas, su rescate y amplificación por pases sucesivos en células infectadas con el virus TGEV (PO a P3). El RNA de las células y los viriones se purificó en el pase 3.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis por RT-PCR de los RNAs amplificados en células infectadas en presencia de minigenomas que incluyeron las secuencias A1, A2, A3, A4 y B. En el gel superior se muestran los productos de las reacciones de RT-PCR específicas para la detección del genoma (O), minigenomas (Mi) y mRNAs (mR) en las células infectadas. En el gel inferior se muestran los productos de las reacciones de RT-PCR específicos detectados en viriones purificados, correspondientes a los análisis mostrados en el gel superior. La amplificación por PCR de los mRNAs y minigenomas se realizó con el oligonucleótido OUS 297, que no hibridaba con el genoma del virus.

La Figura 12 ilustra la localización de la señal de encapsidación en el genoma del virus



TGEV. Se representa esquemáticamente el genoma del virus TGEV incluyendo las distintas ORFs del virus. La posición de las señales de encapsidación de los coronavirus TGEV, MHV y BCoV se indican con una flecha. La posición aproximada de las señales de encapsidación en el genoma del virus se muestra debajo del genoma. ES, señal de encapsidación.

La Figura 13 ilustra esquemáticamente la relocalización de la señal de encapsidación en el genoma del virus TGEV. En el esquema superior se representa el genoma del virus TGEV con las ORFs E y N deletionadas (ΔE y ΔN). Se representan las distintas ORFs del virus y la señal de encapsidación (ES). La flecha indica la relocalización de la ES desde el extremo 5' al extremo 3', resultando en un nuevo genoma con la señal de encapsidación localizada en la posición de la ORF E deletionada (esquema inferior). UTR, región no traducible.

En un aspecto, la invención proporciona una secuencia, aislada, de ácido nucleico, en adelante secuencia de ácido nucleico de la invención, seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende desde el nucleótido 100 al nucleótido 649 del genoma de un coronavirus del grupo 1, incluyendo dicha secuencia de nucleótidos la secuencia de encapsidación (SE) de dicho coronavirus;
- b) una secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia definida en a) que contiene la secuencia de encapsidación (SE) de un coronavirus del grupo 1;
- c) una secuencia de ácido nucleico complementaria a cualquiera de dichas secuencias a) o b); y
- d) una secuencia de un ácido nucleico con una estructura secundaria similar a la de una secuencia de encapsidación (SE) de un coronavirus del grupo 1, independientemente de la secuencia de nucleótidos.

El término "ácido nucleico" tal como se utiliza en esta descripción incluye cualquier molécula de DNA o RNA.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término "coronavirus del grupo 1" incluye coronavirus porcinos, tales como TGEV, el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV); caninos, por ejemplo el coronavirus canino (CCoV); felinos, por ejemplo, el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV); humanos (HCoV-229E); y, otros coronavirus estrechamente relacionados con ellos en su secuencia.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de ácido nucleico que tenga un elevado porcentaje, igual o superior al 40%,

de nucleótidos idénticos o que presente la misma característica técnica de la secuencia definida en a), es decir, que contiene la SE de un coronavirus de grupo 1. Dicha secuencia de ácido nucleico análoga puede contener sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, o bien puede contener uno o más nucleótidos adicionales en cualquiera de sus extremos, o bien puede presentar una o más deleciones, siempre y cuando se mantenga la SE del coronavirus del grupo 1. En general, dicha secuencia de ácido nucleico análoga definida en b) es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos definida en a). En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 60%; preferentemente de, al menos un 80%, o más preferentemente de, al menos, un 95%. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia definida en a) [secuencia b)] es un fragmento de dicha secuencia de nucleótidos definida en a) que incluye la SE del coronavirus del grupo 1.

La invención también incluye secuencias de ácido nucleico complementarias a las secuencias de ácido nucleico identificadas como a) o b), así como secuencias de ácidos nucleicos, en particular RNA, con estructuras secundarias similares a las de, al menos, una SE de un coronavirus del grupo 1, independientemente de la secuencia de nucleótidos. Estas secuencias secundarias fueron previstas utilizando el programa informático M-fold (Zucker, 1989a y b) y su existencia fue comprobada por métodos genéticos, enzimáticos y químicos.

En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1. La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 corresponde a la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 100 y el nucleótido 649 del cDNA del genoma del virus TGEV, en concreto del aislado PUR-46 MAD, un aislado representativo de TGEV, cuya secuencia completa se describe en la solicitud de patente española P9902673, y contiene la SE de dicho virus. En otra realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención comprende un fragmento de dicha SEC. ID. N°: 1 que contiene la SE del virus TGEV.

La localización de la SE del virus TGEV entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma del virus ha resultado sorprendente, entre otras cosas porque la SE en el coronavirus MHV se ha situado a 1,4 kb del extremo 3' del gen de la replicasa (Fosmire y cols., 1992), es decir, una zona que está a casi 20.000 nt de la descrita aquí para la SE en el genoma del virus TGEV.

La secuencia de ácido nucleico de la invención puede proceder de cualquier organismo que la contenga de forma natural, por ejemplo, un coronavirus del grupo 1, o de un organismo

hospedador transformado con dicha secuencia de ácido nucleico, o, en general, de cualquier organismo que la contenga. Por tanto, la secuencia de ácido nucleico de la invención puede obtenerse utilizando métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas de aislamiento e identificación de ácidos nucleicos a partir de cualquier organismo que la contenga o de un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ácido nucleico, mediante el empleo de sondas u oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos proporcionada por esta invención.

Una característica esencial de la secuencia de ácido nucleico de la invención radica en que dicha secuencia incluye la SE de un coronavirus del grupo 1. La identificación de la SE del genoma permite, entre otras cosas, el estudio de los mecanismos de encapsidación de coronavirus y la generación de nuevos vectores virales bioseguros para el diseño de nuevas vacunas y para terapia génica, aplicables en salud animal y humana. La localización de la SE del genoma tiene una gran importancia práctica, además de científica, y puede utilizarse, por ejemplo, en el desarrollo de vectores útiles con fines vacunales o destinados a terapia génica derivados de dichos coronavirus del grupo 1.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico (I) seleccionada entre (i) una secuencia de ácido nucleico correspondiente al genoma completo, o a una parte del mismo, de un coronavirus del grupo 1, y (ii) una secuencia de ácido nucleico de otro virus que tiene una identidad de secuencia igual o superior al 60% con dicha secuencia (i); a la que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho virus, y una secuencia de ácido nucleico de la invención.

En una realización particular, dicha secuencia de ácido nucleico de la invención se ha relocalizado en una posición distinta a la original (es decir, en una posición distinta a la posición en la que habitualmente se encuentra en el virus tipo salvaje), por ejemplo, en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen delecionado o de uno de los genes delecionados, dando lugar, de este modo, a un vector bioseguro, es decir, que podría regenerar un virus competente en replicación y propagación por recombinación con otro virus circulante con una frecuencia igual o inferior a 10^{-10} . Por tanto, un vector como el proporcionado por esta invención presenta un elevado nivel de bioseguridad ya que la frecuencia de regeneración de virus infectivo a partir de una recombinación entre el vector y un virus de campo es muy baja [véase el Ejemplo, apartado "3. Discusión"].

En una realización particular, el vector proporcionado por esta invención es un vector viral derivado de un coronavirus del grupo 1, por ejemplo, TGEV, que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente al genoma de dicho coronavirus del grupo 1, o un fragmento del mismo, al que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho coronavirus y en el que la secuencia de ácido nucleico de la invención se ha localizado en una posición distinta a la original, por ejemplo, en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen delecionado o de uno de los genes delecionados.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción de un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención junto con, opcionalmente, una secuencia promotora de la transcripción. Dicha construcción puede encontrarse en un RNA o en una copia cDNA de un plásmido o vector que posee un origen de replicación y es, por tanto, potencialmente capaz de replicarse en una célula adecuada. El ensamblaje de los elementos reguladores de la transcripción, así como la introducción de dicha construcción en un plásmido, puede realizarse mediante técnicas convencionales [Sambrook et al., 1989]. Dicha construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención así como los plásmidos que la codifican, constituyen objetos adicionales de esta invención.

A partir del vector proporcionado por esta invención se pueden transformar células apropiadas y recuperar los viriones obtenidos que contienen la construcción proporcionada por esta invención. Por tanto, la invención proporciona, además, un método para producir un coronavirus recombinante que comprende la introducción de un vector proporcionado por esta invención en una célula hospedadora, el cultivo de dicha célula bajo condiciones que permiten la expresión y replicación del vector viral y la recuperación de los viriones obtenidos. La introducción del vector de la invención en la célula hospedadora puede realizarse por métodos convencionales. Dichas células hospedadoras que contienen el vector de la invención constituyen un objeto adicional de la presente invención.

Adicionalmente, el vector proporcionado por esta invención se puede manipular por técnicas de ingeniería genética convencionales para insertar, al menos, una secuencia de un ácido nucleico heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el control de los elementos reguladores de la transcripción presentes en dicho vector. Por tanto, en otra realización particular, el vector proporcionado por esta invención comprende, además, un ácido nucleico heterólogo bajo el control de los elementos reguladores de la transcripción presentes en dicho vector para permitir la expresión de dicho ácido nucleico heterólogo.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “heterólogo” aplicado a un ácido nucleico se refiere a una secuencia de ácido nucleico que no está presente normalmente en el vector empleado para introducir el ácido nucleico heterólogo en una célula hospedadora.

El ácido nucleico heterólogo que puede contener el vector viral de la invención puede ser un gen, o un fragmento del mismo, que codifica una proteína, un péptido, un epítipo o cualquier producto génico de interés (por ejemplo, anticuerpos, enzimas, etc). El ácido nucleico heterólogo se puede insertar en el vector de la invención mediante técnicas de ingeniería genética convencionales en cualquier región apropiada del cDNA, por ejemplo, después del codon iniciador de la traducción de un gen que codifica para una proteína de un coronavirus del grupo 1 y en fase de lectura con ese gen.

El vector de la invención puede expresar una o más actividades. En este último caso, el vector viral incluirá tantas secuencias de ácido nucleico heterólogo como actividades se van a expresar precedidas de uno o varios promotores, o bien de un promotor y varios sitios de reconocimiento del ribosoma (IRES), o bien de varios promotores y un sitio de reconocimiento del ribosoma.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto de interés que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector viral de la invención bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico heterólogo y recuperar el producto de interés. Dichas células hospedadoras que contienen el vector viral de la invención constituyen un objeto adicional de la presente invención.

El vector viral de la invención puede ser diseñado de forma que se pueda controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo. Debido a estas características, una aplicación muy interesante de los vectores virales de la invención es su empleo en terapia génica como vector del gen de interés o como vector vacunal para inducir respuestas inmunes frente a diferentes patógenos.

La invención proporciona, además, vacunas capaces de inducir protección en un animal frente a la infección causada por un agente infeccioso que comprende (i) al menos, un vector viral de la invención que expresa, al menos, un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmune frente a dicho agente infeccioso, o un anticuerpo que proporciona protección contra dicho agente infeccioso, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por “inducir protección”, en el sentido utilizado en esta descripción, debe entenderse la

respuesta inmune del organismo receptor (animal a inmunizar) inducida por el vector viral de la invención, a través de los mecanismos adecuados tales como los inducidos por sustancias potenciadoras de la respuesta celular (interleuquinas, interferones, etc.), factores de necrosis celulares y sustancias similares que hacen que el animal quede protegido frente a infecciones causadas por agentes infecciosos.

El término “animal” incluye a cualquier animal, de cualquier especie, preferentemente mamíferos, incluido el hombre.

El término “agente infeccioso”, en el sentido utilizado en esta descripción incluye a cualquier agente infeccioso viral, bacteriano, fúngico, parasitario, u-otros-que-puedan infectar a un animal y ocasionarle una patología.

En una realización particular, la vacuna proporcionada por esta invención comprende al menos un vector viral de la invención que expresa, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y/o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas. Los vectores objeto de la invención son adecuados para inducir inmunidad en mucosas así como inmunidad lactogénica, de especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal.

En otra realización particular, la vacuna proporcionada por esta invención comprende, al menos, un vector viral de la invención que expresa, al menos, un gen que codifica para las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG₁, IgA, etc.) que proporciona protección contra un agente infeccioso.

La especificidad de especie se puede controlar de forma que el vector viral exprese la proteína S de la envuelta, de un coronavirus que infecta la especie deseada (humana, canina, felina, porcina, etc.), adecuada para ser reconocido por los receptores celulares de la especie correspondiente.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden ser monovalentes o multivalentes dependiendo de si los vectores virales de la invención expresan uno o más antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno o más agentes infecciosos o bien uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas monovalentes capaces de proteger al hombre, cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos humanos, porcinos, caninos y felinos, y el tropismo se controla expresando la glicoproteína S del coronavirus con la especificidad de especie deseada.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos humanos pueden contener un vector que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de patógenos humanos, especialmente agentes infecciosos humanos seleccionados entre aquellos causantes de infecciones de mucosas entéricas y/o respiratorias o bien cuya vía de entrada sea a través de dichas mucosas, por ejemplo, coronavirus humanos, rinovirus humanos, rotavirus humanos, enterovirus humanos, virus de la gripe, y, en general, cualquier patógeno infeccioso, incluyendo virus y bacterias, que infectan a humanos.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos porcinos pueden contener un vector que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos porcinos: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Parvovirus porcino*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Pasterella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium sp.*, *Serpulina hydrosentariae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, PEDV, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, virus de la fiebre aftosa (FMDV), o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos caninos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos caninos: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus), virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos felinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos felinos: calicivirus del gato, virus de la inmunodeficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino, rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, *Chlamydia psittaci* felina, y virus de la leucemia felina.

Los vectores de la invención pueden expresar un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, por ejemplo, un agente infeccioso porcino, canino o felino como los citados previamente. En una realización particular, el vector expresa el anticuerpo

monoclonal recombinante identificado como 6A.C3 que neutraliza el virus TGEV, expresado con isotipos IgG₁ o IgA en el que la parte constante de la inmunoglobulina es de origen porcino o anticuerpos neutralizantes para rotavirus humanos y porcinos.

Como excipiente puede utilizarse un diluyente tal como suero salino fisiológico u otras soluciones salinas similares. Asimismo, estas vacunas pueden contener también un adyuvante de los habitualmente utilizados en la formulación de vacunas, tanto acuoso, tal como hidróxido de aluminio, QuilA, suspensiones de geles de alúmina y similares, como oleoso, a base de aceites minerales, glicéridos y derivados de ácido graso, y sus mezclas.

Estas vacunas también pueden contener sustancias potenciadoras de la respuesta celular (PRC), es decir, sustancias potenciadoras de subpoblaciones de células T helper (Th₁ y Th₂) tales como interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, g-IFN (interferón gamma), factor de necrosis celular y sustancias similares, que podrían, teóricamente, provocar inmunidad celular en los animales vacunados. Estas sustancias PRC podrían utilizarse en formulaciones vacunales con adyuvantes acuosos u oleosos. También pueden utilizarse otro tipo de adyuvantes que modulan e inmunoestimulan la respuesta celular tales como el MDP (muramil dipéptido), ISCOM (Immuno Stimulant Complex) o liposomas.

La invención proporciona vacunas multivalentes capaces de prevenir y proteger animales de las infecciones causadas por distintos agentes infecciosos. Estas vacunas multivalentes pueden elaborarse a partir de vectores virales de la invención en los que se han insertado las distintas secuencias que codifican los antígenos correspondientes en el mismo vector recombinante o bien construyendo vectores recombinantes independientes que posteriormente se mezclarían para su inoculación conjunta. Por tanto, estas vacunas multivalentes comprenden un vector viral que contiene más de una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos que codifican para más de un antígeno o, alternativamente, distintos vectores virales que expresan, cada uno de ellos, al menos un antígeno distinto.

Análogamente, se pueden preparar vacunas multivalentes que comprenden vectores multivalentes utilizando secuencias que codifican anticuerpos que proporcionan protección contra agentes infecciosos en lugar de secuencias que codifican los antígenos.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas capaces de conferir inmunidad a hombres, cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos humanos, porcinos, caninos y felinos, respectivamente. Para ello, los vectores virales contenidos

en la vacuna deben expresar distintos antígenos de los patógenos humanos, porcinos, caninos o felinos previamente mencionados.

Las vacunas de esta invención pueden presentarse en forma líquida o liofilizada y pueden prepararse suspendiendo los sistemas recombinantes en el excipiente. Si dichos sistemas
5 estuvieran en forma liofilizada, el propio excipiente podría ser el reconstituyente.

Alternativamente, las vacunas proporcionadas por esta invención se pueden utilizar en combinación con otras vacunas convencionales, ya sea formando parte de las mismas o bien como diluyente o fracción liofilizada para diluirse con otras vacunas ya sean convencionales o recombinantes.

10 Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden administrarse al animal por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol.

Una característica propia de las vacunas proporcionadas por esta invención es su elevado nivel de bioseguridad, derivado del hecho de que se parte de vectores derivados de genomas virales a los que se les ha delecionado un gen esencial para el ensamblaje del virus y en los que
15 se ha relocalizado la SE en posición adyacente o al lado del gen delecionado con lo que el riesgo de que se recupere el virus salvaje por recombinación es prácticamente inexistente.

La invención también proporciona un método para la inmunización de animales, en particular, hombres, cerdos, perros y gatos, contra uno o varios agentes infecciosos de forma simultánea, que comprende la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica,
20 intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) de una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

Adicionalmente, la invención también proporciona un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichos animales, que consiste
25 en la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) a las madres antes de o durante el periodo de gestación, o a su progenie, una vacuna de las proporcionadas por esta invención.

La invención se ilustra mediante el siguiente ejemplo que describe la identificación de una región del genoma de TGEV que contiene la SE de dicho coronavirus. Este ejemplo no debe
30 ser considerado como limitativo del alcance de la invención sino como ilustrativo de la misma.

EJEMPLO

IDENTIFICACIÓN DE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN EN EL GENOMA DEL VIRUS TGEV

1. Materiales y Métodos

1.1 Diseño experimental

El diseño experimental para la identificación de la SE en el virus TGEV se basó en la detección de la encapsidación de RNAs mediante inmunocaptura de viriones acoplada a la detección de los RNAs por RT-PCR. Se estudió la secuencia de RNA que habría que añadir a un RNA subgenómico mensajero para que se encapsidara en viriones. Para ello, se tomó como base el minigenoma M39-GUS, que se encapsida específicamente, en contraste con el RNA mensajero subgenómico para el gen *gus* (sgmGUS o mRNA-GUS). Las secuencias que podrían contener la SE (Figura 1) se clonaron después de la secuencia conservada CTAAAC (CUAAAC en el RNA) de la secuencia reguladora de la transcripción (TRS) del minigenoma (Figura 2). Los RNAs mensajeros derivados del minigenoma estarían formados por la secuencia líder fusionada a la secuencia conservada (CUAAAC) seguida del resto de la secuencia del minigenoma. Estos minigenomas producirían mRNAs subgenómicos que potencialmente contendrían la región responsable de la encapsidación del genoma, y estos mensajeros, en principio, se encapsidarían en viriones.

1.2 Clonaje en el minigenoma M39-GUS de las secuencias que potencialmente contienen la SE

Para la selección de las secuencias que potencialmente contendrían la SE se partió del minigenoma M33, el más pequeño que se rescata eficientemente en cultivos celulares (Figuras 1 y 3). La SE se restringió a dos zonas discontinuas en el genoma del virus, presentes en la región 5' del minigenoma M33. La primera zona, la región A, se compone de los primeros 2.144 nucleótidos del extremo 5' del virus, y la segunda, la región B, procede de 568 nt de la secuencia solapante entre las ORFs 1a y 1ab, entre los nucleótidos 12.195 y 12.763 del genoma del virus TGEV. A su vez, la región A se subdividió en fragmentos de 550 nt, que se solapaban 50 nt entre sí (Figura 1). Estos fragmentos se amplificaron por PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos (Tabla 1) que flanqueaban cada una de las regiones, introduciendo secuencias de restricción *SaI* en los extremos de los fragmentos amplificados. Los fragmentos de PCR se digirieron directamente con el enzima *SaI* y se clonaron en el plásmido pSL1190 (pCMV)-M39-

GUS cortado con el enzima *SaII* (Figura 2). Los plásmidos obtenidos se analizaron por secuenciación, seleccionando aquéllos que contenían las regiones A1, A2, A3, A4 y B en fase (Figura 2).

5

Tabla 1

Oligonucleótidos empleados para la amplificación y clonaje de las regiones A y B

Región	Oligonucleótido (+)	Oligonucleótido (-)	Zona del genoma amplificada (nt)
A1	GGGTCGACGAAATATTTGT CTTTCTATGAAATC	CCGTCGACATGGCACCTCTGA CAGTGCGAGC	100-649
A2	GGGTCGACCGTTCTTGAGG ACTTTGACCTTAAAATTG	CCGTCGACCATCACCAGGCTT AATATCACCC	599-1149
A3	GGGTCGACTTTCTGGCAAA GTAAAGGGTGTC	CCGTCGACACGATTGTCTGGA ACCACAAATGTTGGC	1099-1649
A4	GGGTCGACGCTTTTACGAT TGTAAGCTACAAGCC	CCGTCGACTTCAAATGATGAA CCAAGTTTTCG	1599-2144
B	GGGTCGACCAAATACCAAC TGGCACACAAGATCC	CCGTCGACAATTCTTCAGTGC AAGCACCTACTGTC	12195-12763

1.3 Rescate de los minigenomas generados

10

Se transfectaron en células epiteliales de testículo de cerdo (ST) por lipofección 5 µg de cada plásmido que incluían cada uno de los minigenomas bajo el control del promotor de CMV. Las células se infectaron con el virus TGEV a una multiplicidad de infección (mdi) de 5 a las 12 horas post-transfección. Los sobrenadantes obtenidos de la transfección/infección se utilizaron para infectar células ST confluentes (pase 1) y el sobrenadante se volvió a pasar otras dos veces en células ST (pases 2 y 3) (Figura 4).

15

1.3.1 Detección de minigenomas y mRNAs subgenómicos en células ST y en los viriones

20

El RNA de las células infectadas se purificó en el pase 3 y se detectaron los minigenomas y los mRNAs subgenómicos de los minigenomas por RT-PCR. Para la detección del minigenoma y de los mRNAs subgenómicos se realizó una reacción de RT utilizando el oligonucleótido GUS 297 (5'-GACCCACACTTTGCCGTAATGAG-3'). El minigenoma se

amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos GUS 297 y 19949 (5'-CTTGGTGGATCTGTTGCC-3'). El mRNA subgenómico se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos GUS 297 y líder. Los productos de las RT-PCRs se analizaron por electroforesis en gel de agarosa junto con marcadores de tamaño molecular.

- 5 Los viriones generados de las células infectadas (pase 3) se concentraron y se inmunopurificaron. El análisis de los minigenomas y mRNAs se realizó por RT-PCR.

2. Resultados

2.1 Detección de RNAs genómico y subgenómicos en células ST infectadas con el virus TGEV

10

En primer lugar se puso a punto la detección de RNAs subgenómicos del virus en células infectadas con el virus TGEV. Se diseñaron amplificaciones por RT-PCR específicas para cada uno de los RNAs subgenómicos, utilizando los oligonucleótidos específicos descritos anteriormente. Los productos de las reacciones de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los productos mayoritarios de las reacciones de RT-PCR mostraron el tamaño esperado para cada uno de los RNAs del virus. Estos productos se secuenciaron para confirmar que correspondían a los distintos mRNAs del virus TGEV (Figura 5).

15

2.2 Detección de los RNAs genómico y subgenómicos en preparaciones de virus purificados

20

2.2.1 Purificación de los viriones TGEV

25

Para comprobar si la detección de mRNAs subgenómicos en viriones purificados dependía del proceso de purificación, es decir, para determinar si se encapsidaban específicamente o si eran contaminaciones, se obtuvieron preparaciones de virus purificados utilizando tres métodos distintos. El primer método consistió en la concentración de virus por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31%, partiendo de sobrenadantes de células ST infectadas. En el segundo método, además de la concentración a través del colchón de sacarosa, el virus se purificó por centrifugación en un gradiente continuo de sacarosa. En el tercer método se cambió de estrategia. El virus previamente concentrado por ultracentrifugación se purificó por inmunocaptura con el Acm 25.22, específico para el extremo amino de la proteína M. La pureza de las preparaciones de virus se estimó mediante análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata en el caso de los dos primeros métodos, y mediante electroforesis SDS-PAGE y fluorografía en el tercer método, utilizando virus

30

marcado radiactivamente (Figura 6). En el virus concentrado se detectaron las tres proteínas estructurales mayoritarias del virus y proteínas contaminantes de alto peso molecular. En las preparaciones de virus purificado por gradiente de sacarosa y por inmunocaptura no se detectaron proteínas contaminantes.

5

2.2.2 Detección de los RNAs genómico y subgenómicos en preparaciones de virus purificados

A continuación se investigó la presencia de los RNAs genómico y subgenómicos en las preparaciones de virus purificado amplificados por RT-PCR (Figura 7). En el virus concentrado se detectaron el genoma y los RNAs subgenómicos S, E y M. En el virus purificado por gradiente de sacarosa se detectaron el genoma y los mRNAs E y M, pero no el S, previamente detectado. En el virus purificado por inmunocaptura se detectaron el genoma y el mRNA E. Cuando durante la inmunocaptura se incrementó el número de lavados de 10 a 15 veces en ausencia de detergente, o incluyendo el detergente Tween-20 a dos concentraciones (0,05% y 0,5%), solo se detectó el RNA genómico. Debido a que la detección de los mRNAs del virus dependía del proceso de purificación de los virus, y a que cuando se extremó la pureza de los viriones no se identificó la presencia de mRNAs en los mismos, se concluyó que los mRNAs detectados en virus purificado eran contaminantes y no se habían encapsidado.

10

15

2.3 Detección del minigenoma M39-GUS y del subgenómico sgmGUS en células infectadas y en viriones purificados por inmunocaptura

20

25

30

Para determinar la encapsidación de RNAs de minigenomas que no se perdían durante pases sucesivos en cultivos celulares (Alonso y cols., 2002), se utilizó un sistema basado en la infección de células ST con preparaciones de virus TGEV que contenían viriones con el minigenoma M39-GUS. Este minigenoma presenta las señales necesarias para su replicación y encapsidación, e incorpora una unidad transcripcional compuesta por una TRS derivada del gen N seguida del gen trazador *gus*. Este minigenoma se replica en las células infectadas y también transcribe el mRNA subgenómico para el gen *gus* (sgmGUS o mRNA-GUS). Se diseñó una estrategia de detección específica para el minigenoma M39-GUS y su mensajero por RT-PCR (Figura 8A). Para la detección específica del mRNA se utilizó un oligonucleótido que hibridaba con el gen *gus* junto con un oligonucleótido complementario a la secuencia líder del genoma del virus y de los mRNAs subgenómicos. En principio, utilizando esta RT-PCR se debería detectar el minigenoma M39-GUS, aunque en las condiciones en las que se realizó la RT-PCR (es decir,

tiempos de elongación cortos) únicamente se amplificó el mensajero GUS, con 374 pb, pero no el producto derivado del minigenoma con una longitud teórica de 3.700 pb.

La presencia del genoma, minigenoma y el mRNA-GUS se investigó en células infectadas y en viriones purificados por inmunocaptura a partir de los sobrenadantes de estas células infectadas (Figura 8B). En las células se detectaron los RNAs correspondientes al genoma, al minigenoma M39-GUS y al mRNA GUS. La naturaleza de estas bandas se confirmó secuenciando los productos de las reacciones de RT-PCR. En la reacción para la detección del mRNA-GUS apareció un producto inesperado con un tamaño aproximado de 1.070 nt. Este producto se secuenció comprobándose que se generó en la reacción de RT-PCR por hibridación inespecífica del oligonucleótido GUS con el extremo 5' del genoma y del minigenoma. En los viriones purificados por inmunocaptura se detectó el RNA genómico, el minigenoma M39-GUS, pero no el mensajero GUS, en contraste con los resultados obtenidos en las células infectadas. La banda inespecífica de 1.070 nt también se detectó en los viriones inmunopurificados. En análisis sucesivos se empleó el oligonucleótido GUS 297, que no hibridó inespecíficamente con el genoma.

2.4 Identificación de la SE en el genoma del virus TGEV

Una vez comprobado que los mRNAs subgenómicos no se encapsidan en viriones, en contraste con los minigenomas, se diseñaron construcciones basadas en el minigenoma M39-GUS que produjeran mRNAs subgenómicos incluyendo secuencias que potencialmente contuvieran la SE. El minigenoma más pequeño derivado del virus TGEV que se rescató eficientemente en cultivos celulares era el M33 (Figura 9A), lo que sugería que este minigenoma incluía la SE en el extremo 5' del minigenoma. Esta SE en principio procedía de dos zonas discontinuas del genoma del virus, A y B, que se localizaban en los primeros 2.144 nt del genoma del virus o en los 568 nt de la región solapante entre los genes 1a y 1b (del nucleótido 12.195 al nucleótido 12.763), respectivamente (Figura 9B).

Para localizar la posición de la SE, la zona A se subdividió en cuatro fragmentos de 550 nt, que se solapan entre sí a lo largo de 50 nt (Figura 9B). Estos fragmentos, además de la región B, se amplificaron por PCR, y cada fragmento se clonó en el minigenoma M39-GUS directamente bajo el control de la TRS optimizada, siguiendo a la secuencia conservada 5'-CUAAAC-3' y la secuencia que flanquea el lado 3' de la secuencia CS (5'-ACGTCGACGA-3') (Figura 10).

Los minigenomas generados se transfectaron en células ST donde se transcribieron bajo el promotor de CMV. Los minigenomas generados se rescataron por infección con el virus complementador TGEV. Los viriones generados en las células ST transfectadas e infectadas se pasaron tres veces en cultivos celulares para amplificar los minigenomas.

5 La presencia del genoma, minigenomas y mRNAs se estudió en las células infectadas y en los viriones purificados. Independientemente de la secuencia introducida en los minigenomas, el genoma, los minigenomas y sus mensajeros se detectaron en las células infectadas (Figura 11). Sin embargo, en los viriones purificados a partir de las células infectadas solo se detectó el
10 mRNA cuando los viriones se habían producido en células que se transfectaron con el minigenoma M39-GUS-A1. En contraste, en el resto de los virus purificados a partir de las otras células transformadas solamente se detectó el genoma y los minigenomas, pero no los mRNAs.

En el caso de los viriones procedentes de las células infectadas en presencia del minigenoma que contenía la secuencia A1, el RNA más abundante fue el mRNA-A1, es decir, el que incluía la secuencia del genoma desde el nucleótido 100 al 649. Incluso comparando los
15 productos de las reacciones de RT-PCR con el resto de las construcciones, se observó repetidamente que el genoma del virus en el caso de la construcción A1 estaba presente en menor cantidad que en el resto de las construcciones, tal como se determinó por RT-PCR. Estos resultados sugirieron fuertemente que el mRNA-A₁ se encapsidaba muy eficientemente, inhibiendo la encapsidación del propio genoma del virus.

20 Los resultados obtenidos indican que la SE del virus se localizó en el extremo 5' del genoma, entre los nucleótidos 100 y 649, ya que su inserción en un mRNA subgenómico que no se encapsida, dio lugar a su encapsidación eficiente en viriones. Este resultado difiere del obtenido en los coronavirus MHV y BCoV, en los que la SE se ha localizado alejada del extremo 5' del virus, alrededor de la posición 20.300 del genoma de estos virus (Figura 12).

25

3. Discusión

El virus TGEV encapsidó el RNA genómico y los minigenomas, pero no los mRNAs del virus. Para la identificación de la SE se utilizó una estrategia de acción positiva, es decir, en la que se mostrase la encapsidación de mRNAs como consecuencia de la inserción de señales de
30 encapsidación en los mismos. Esta estrategia consistió en la inserción de regiones provenientes del extremo 5' del minigenoma M33, bajo el control de la secuencia TRS del minigenoma M39-GUS. De esta manera, en las células infectadas en presencia de estos minigenomas se

producirían mRNAs con las secuencias indicadas clonadas en el minigenoma. Estas construcciones se rescataron en células ST transfectadas e infectadas con el virus TGEV complementador. En los viriones liberados de las células infectadas se detectaron solamente los mensajeros que contenían la secuencia comprendida desde las posiciones 100 a 649 del genoma, indicando que la SE se encuentra en este fragmento de RNA. Dado que estas señales de encapsidación tienen un tamaño inferior a 100 nt, tal como se ha descrito en el coronavirus MHV (Fosmire y cols., 1992), queda pendiente por determinar las secuencias mínimas necesarias para la encapsidación de RNAs en el virus TGEV.

El RNA genómico fue el más abundante en virus purificados procedentes de células infectadas con virus en presencia de minigenomas. Sin embargo, cuando los minigenomas contenían la capacidad para transcribir mRNAs que incluían la SE, el RNA más abundante en virus purificados fue el mRNA. Este resultado indicó que el RNA mensajero que contenía la SE se incorporaba a los viriones muy eficientemente, en detrimento de la encapsidación del RNA genómico y del minigenoma que lo generaba. Posiblemente, la menor cantidad de RNA genómico en los viriones purificados en presencia del minigenoma M39-GUS-A1 y su mRNA, se debió a la competición por la encapsidación entre el genoma del virus, el minigenoma y el mRNA.

La encapsidación podría estar en principio asociada a la replicación del genoma, tal como sucede en poliovirus y flavivirus (Khromykh y cols., 2001; Nugent y cols., 1999). Sin embargo, es poco probable que este sea el caso de los coronavirus, porque la encapsidación de mRNAs mediada por la SE en el caso del virus TGEV así como en el coronavirus MHV (Woo y cols., 1997), es independiente de la replicación del RNA, dado que los mRNAs no se replican (el mecanismo de replicación y transcripción tiene distintos requerimientos en los coronavirus) (Bos y cols., 1997; Woo y cols., 1997). Sin embargo, no se puede excluir que la encapsidación de mRNAs en los que se ha introducido artificialmente la SE esté asociada a la transcripción de estos mRNAs, que es el mecanismo por el cual se sintetizan (Baker y Lai, 1990; Sawicki y Sawicki, 1998; van Marle y cols., 1999).

Los resultados obtenidos indican que la SE del virus TGEV se encuentra entre los nucleótidos 100 y 649 del genoma del virus. Ello es sorprendente, dado que la SE en el coronavirus MHV se ha situado a 1,4 kb del extremo 3' del gen de la replicasa (Fosmire y cols., 1992), es decir, una zona que está a casi 20.000 nt de la descrita aquí para la SE en el genoma del virus TGEV. Se desconoce la razón de esta diferencia en la localización de la SE.

Las señales de encapsidación en distintos virus presentan una estructura secundaria definida, con estructuras de RNA en horquilla reconocidas específicamente por las nucleoproteínas de los virus (Fosmire y cols., 1992; Kim y cols., 1998; Woo y cols., 1997; Zhong y cols., 1992).

- 5 La localización de la SE en el genoma del virus TGEV tiene una gran importancia práctica, además de científica. A modo ilustrativo, se pueden desarrollar vectores virales útiles para el desarrollo de vacunas y terapia génica derivados del virus TGEV en los que, como medida de seguridad para evitar la propagación del vector *in vivo*, se han delecionado genes esenciales para el ensamblaje del virus (Figura 13). Para aumentar el nivel de bioseguridad del
- 10 vector, una vez acotada la SE, se puede relocalizar desde el extremo 5' del genoma al extremo 3' del genoma, inmediatamente al lado del gen delecionado (Figura 13). De esta manera se evitará la regeneración de virus infectivo a partir de una recombinación entre el vector y un virus de campo. En el caso de que la recombinación tuviera lugar, el virus de campo adquiriría el extremo 3' del vector, recuperando los genes delecionados. Sin embargo, este proceso
- 15 conllevaría la pérdida de la SE, por lo que no se podría propagar. Únicamente en el caso de una doble recombinación el vector recuperaría tanto la SE como los genes delecionados. Sin embargo, una triple recombinación que llevara a la recuperación de dos genes esenciales delecionados, además de la SE, es un evento poco frecuente (frecuencia de recombinación en torno a $1 \times 10^{-4} \times 1 \times 10^{-4} \times 1 \times 10^{-4} = 1 \times 10^{-12}$) (Sánchez y cols., 1999), lo que añadiría un
- 20 componente de seguridad adicional al vector que presenta delecciones de genes esenciales exclusivamente (Figura 13).

La identificación de la SE del genoma permite el estudio de los mecanismos de encapsidación de coronavirus y la generación de nuevos vectores virales bioseguros para el diseño de nuevas vacunas y para terapia génica, aplicables en salud animal y humana.

25

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, S., Izeta, A., Sola, I. y Enjuanes, L. (2002). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 76:1293-1308.
- 30 Baker, S. C. y Lai, M. M. C. (1990). An *in vitro* system for the leader-primed transcription of coronavirus messenger RNAs. *EMBO J.* 9:4173-4179.

- Bos, E. C. W., Dobbe, J. C., Luytjes, W. y Spaan, W. J. M. (1997). A subgenomic mRNA transcript of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 defective interfering (DI) RNA is packaged when it contains the DI packaging signal. *J. Virol.* 71:5684-5687.
- Cologna, R. y Hogue, B. G. (2000). Identification of a bovine coronavirus packaging signal. *J. Virol.* 74:580-583.
- 5 Fosmire, J. A., Hwang, K. y Makino, S. (1992). Identification and characterization of a coronavirus packaging signal. *J. Virol.* 66:3522-3530.
- Khromykh, A. A., Varnavski, A. N., Sedlak, P. y Westaway, E. G. (2001). Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: Evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin Virus. *J. Virol.* 75:4633-4640.
- 10 Nugent, C. I., Johnson, K. L., Sarnow, P. y Kirkegaard, K. (1999). Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J. Virol.* 73:427-435.
- Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed Cold Spring Harbor Laboratory.
- 15 Sánchez, C. M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J. M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L. (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* 73:7607-7618.
- Sawicki, S. G. y Sawicki, D. L. (1986). Coronavirus minus-strand RNA synthesis and effect of cycloheximide on coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* 57:328-334.
- 20 van Marle, G., Dobbe, J. C., Gultyaev, A. P., Luytjes, W., Spaan, W. J. M. y Snijder, E. J. (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 96:12056-12061.
- 25 Woo, K., Joo, M., Narayanan, K., Kim, K. H. y Makino, S. (1997). Murine coronavirus packaging signal confers packaging to nonviral RNA. *J. Virol.* 71:824-827.
- Zhong, W. D., Dasgupta, R. y Rueckert, R. (1992). Evidence that the packaging signal for nodaviral RNA2 is a bulged stem-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11146-11150.
- Zucker, M. (1989a). Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol.* 180:262-288.
- 30 Zucker, M. (1989b). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244:48-52.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

- 5 <120> Secuencia de acido nucleico que comprende la señal de encapsidación del rna de un coronavirus del grupo 1 y sus aplicaciones

<160> 1

- 10 <170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 550

<212> ADNc

- 15 <213> Virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV)

<400> 1

	GAAATATTTG	TCTTTCTATG	AAATCATAGA	GGACAAGCGT	TGATTATTTT	CATTTCAGTTT	60
	GGCAATCACT	CCTTGGAACG	GGGTTGAGCG	AACGGTGCAG	TAGGGTTCCG	TCCCTATTTT	120
20	GTAAGTCGCC	TAGTAGTAGC	GAGTGCGGTT	CCGCCCCTAC	AACGTTGGGT	AGACCGGGTT	180
	CCGTCCTGTG	ATCTCCCTCG	CCGGCCGCCA	GGAGAATGAG	TTCCAAACAA	TTCAAGATCC	240
	TTGTTAATGA	GGACTATCAA	GTCAACGTGC	CTAGTCTTCC	TATTCGTGAC	GTGTTACAGG	300
	AAATTAAGTA	CTGCTACCGT	AATGGATTTG	AGGGCTATGT	TTTCGTACCA	GAATACTGTC	360
	GTGACCTAGT	TGATTGCGAT	CGTAAGGATC	ACTACGTCAT	TGGTGTTCTT	GGTAACGGAG	420
25	TAAGTGATCT	TAAACCTGTT	CTTCTTACCG	AACCCTCCGT	CATGTTGCAA	GGCTTTATTG	480
	TTAGAGCTAA	CTGCAATGGC	GTTCTTGAGG	ACTTTGACCT	TAAAATTGCT	CGCACTGGCA	540
	GAGGTGCCAT						550

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre:

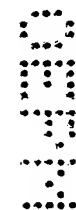
- 5 a) una secuencia de nucleótidos que comprende desde el nucleótido 100 al nucleótido 649 del genoma de un coronavirus del grupo 1, incluyendo dicha secuencia de nucleótidos la secuencia de encapsidación de dicho coronavirus;
- 10 b) una secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia definida en a) que contiene la secuencia de encapsidación de un coronavirus del grupo 1;
- c) una secuencia de ácido nucleico complementaria a cualquiera de dichas secuencias a) o b); y
- 15 d) una secuencia de un ácido nucleico con una estructura secundaria similar a la de una secuencia de encapsidación (SE) de un coronavirus del grupo 1, independientemente de la secuencia primaria de nucleótidos.

20 2. Secuencia según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico es cualquier molécula de DNA o RNA.

3. Secuencia según la reivindicación 1, en el que dicho coronavirus del grupo 1 se selecciona del grupo formado por los coronavirus porcinos, caninos, felinos y humanos.

25 4. Secuencia según la reivindicación 1, constituida por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, o por un fragmento de la misma, que contiene la secuencia de encapsidación del virus de gastroenteritis porcina transmisible (TGEV).

30 5. Una construcción de un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con, opcionalmente, una secuencia promotora de la transcripción.



6. Un plásmido que contiene dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o dicha construcción de ácido nucleico según la reivindicación 5.

7. Un vector que comprende

5 una secuencia de ácido nucleico (I) seleccionada entre (i) una secuencia de ácido nucleico correspondiente al genoma completo, o a una parte del mismo, de un coronavirus del grupo 1, y (ii) una secuencia de ácido nucleico de otro virus que tiene una identidad de secuencia igual o superior al 60% con dicha secuencia (i); a la que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho virus; y

10 una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Vector según la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, ha sido insertada en una posición de la secuencia de ácido nucleico (I) distinta a su posición original en el genoma del virus tipo salvaje, o en una
15 posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen delecionado, o de uno de los genes delecionados, en dicha secuencia de ácido nucleico (I).

9. Vector según la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico (I) es la secuencia del genoma completo de un coronavirus del grupo 1, o de un fragmento del mismo,
20 al que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho coronavirus y en el que dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se ha localizado en una posición distinta a la original en el coronavirus tipo salvaje.

10. Vector según la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de ácido nucleico (I) es la secuencia del genoma completo de un coronavirus del grupo 1, o de un fragmento del mismo,
25 al que se le ha delecionado, al menos, un gen esencial para el ensamblaje de dicho coronavirus y en el que dicha secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se ha localizado en una posición adyacente al, o inmediatamente al lado del, gen delecionado o de uno de los genes delecionados.

30

11. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende, además, una secuencia de un ácido nucleico heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el

control de los elementos reguladores de la transcripción presentes en dicho vector.

12. Un método para producir un producto de interés que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector según la reivindicación 11, bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico heterólogo y recuperar el producto de interés.

13. Un método para producir un coronavirus recombinante que comprende introducir un vector viral según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 en una célula hospedadora, cultivar dicha célula hospedadora que contiene dicho vector bajo condiciones que permiten la expresión y replicación del vector y recuperar los viriones obtenidos del coronavirus recombinante.

14. Una célula hospedadora que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.

15. Una vacuna capaz de inducir protección en un animal frente a la infección causada por un agente infeccioso que comprende (i) al menos, un vector según la reivindicación 11, que expresa, al menos, un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmune frente a dicho agente infeccioso, o un anticuerpo que proporciona protección contra dicho agente infeccioso, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

16. Vacuna según la reivindicación 15, en la que dicho vector expresa, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y/o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas.

17. Una vacuna multivalente capaz de inducir protección en un animal frente a la infección causada por más de un agente infeccioso que comprende (i) un vector según la reivindicación 11, que expresa, unos antígenos adecuados para inducir una respuesta inmune frente a dichos agentes infecciosos, o anticuerpos que proporcionan protección contra dichos agentes infecciosos, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. Una vacuna multivalente capaz de inducir protección en un animal frente a la

infección causada por más de un agente infeccioso que comprende (i) más de un vector según la reivindicación 11, cada uno de los cuales expresa un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmune frente a cada uno de dichos agentes infecciosos, o anticuerpos que proporcionan protección contra cada uno de dichos agentes infecciosos, junto con,
5 opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

15

20

25

FIGURA 1

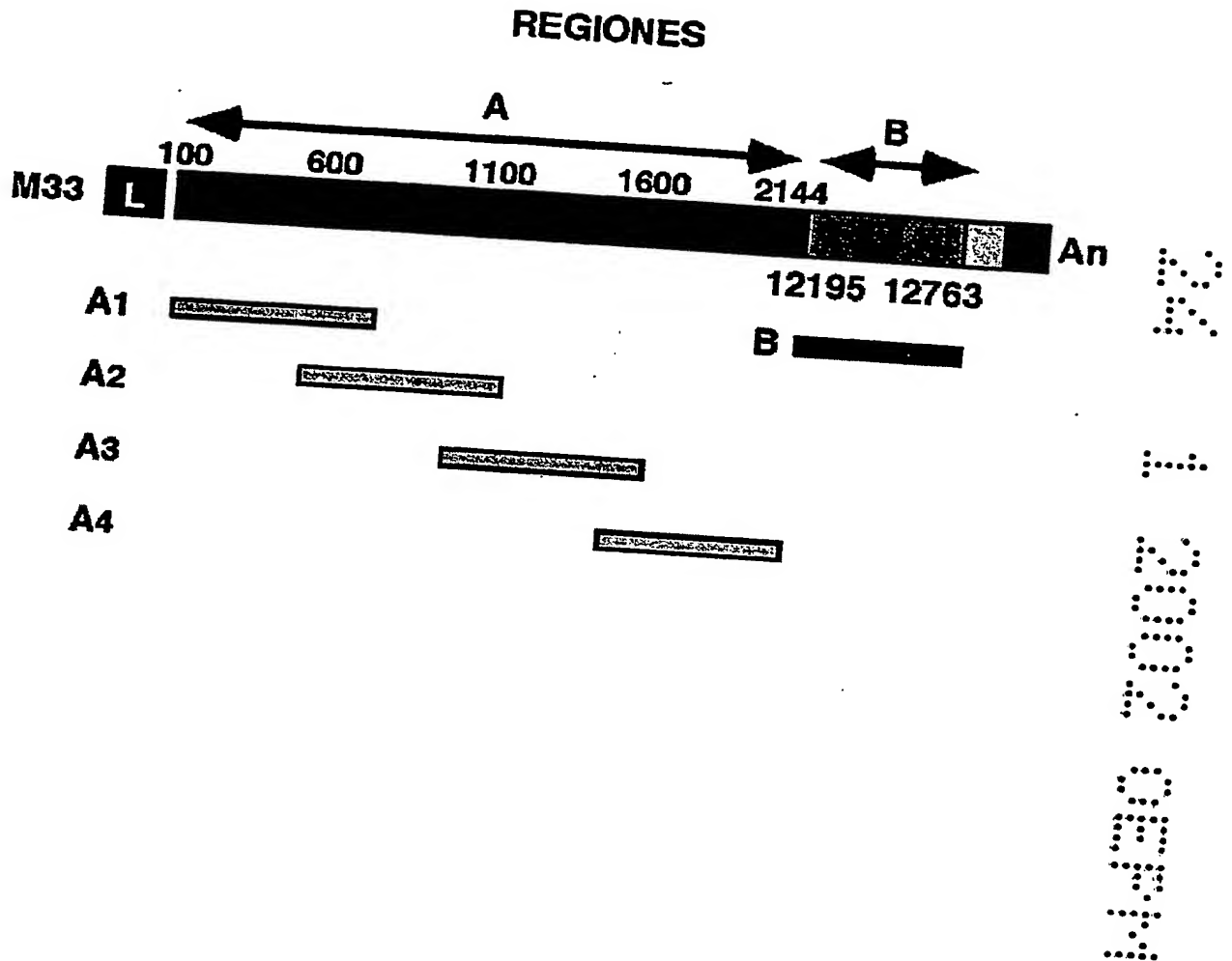


FIGURA 2

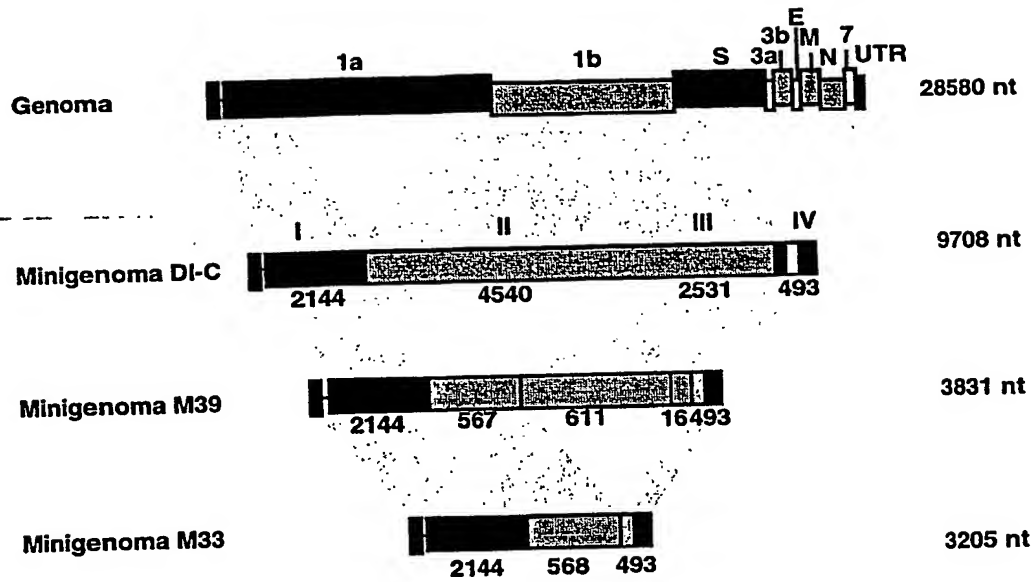
FIGURA 3

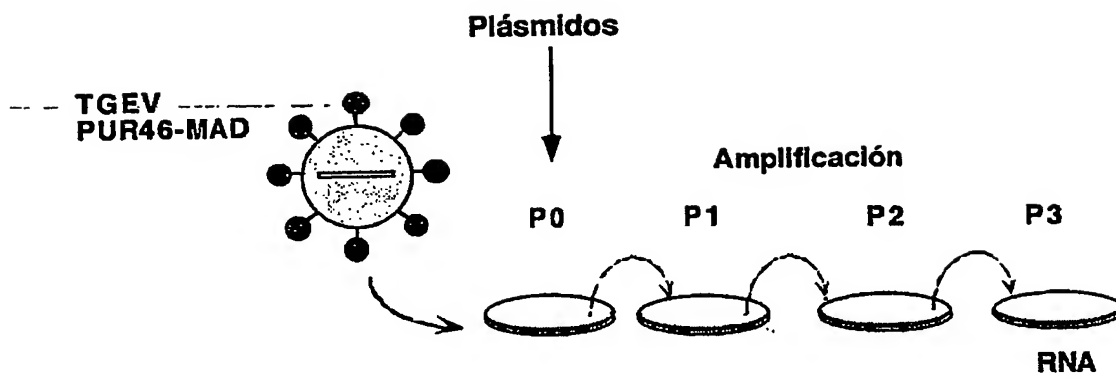
FIGURA 4

FIGURA 5

33

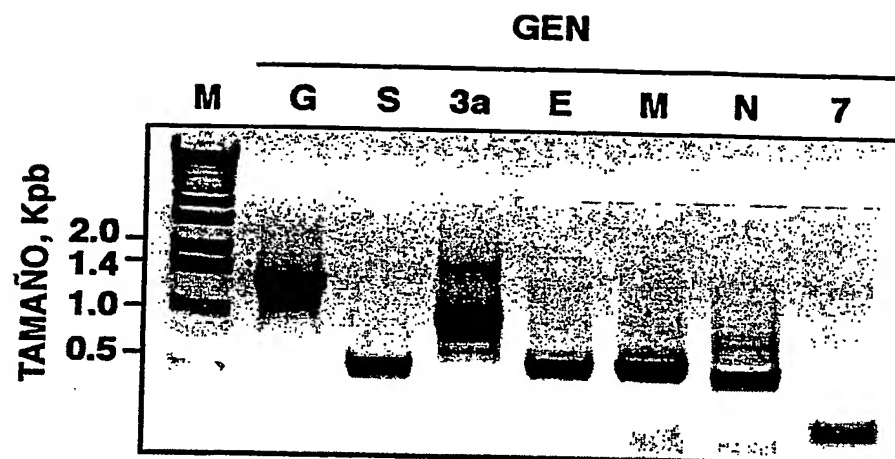


FIGURA 6

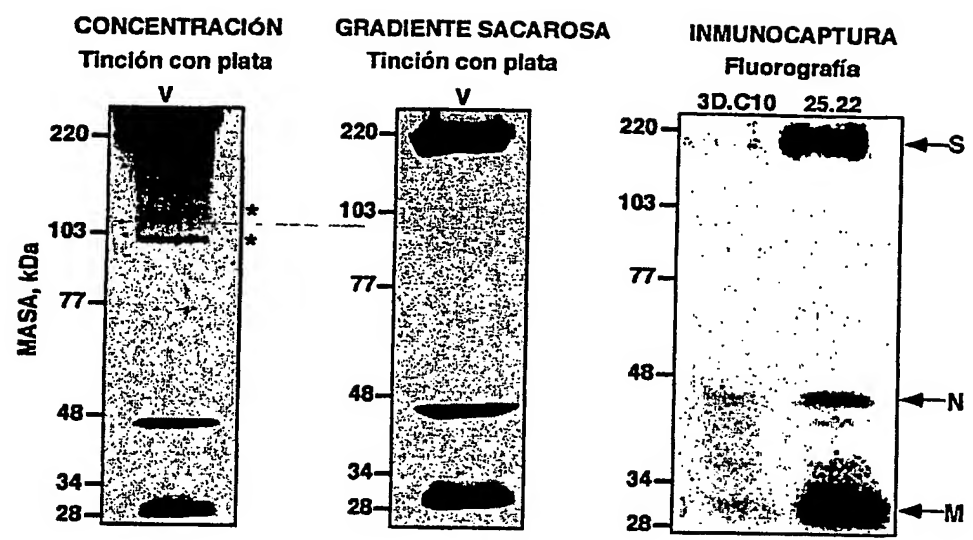


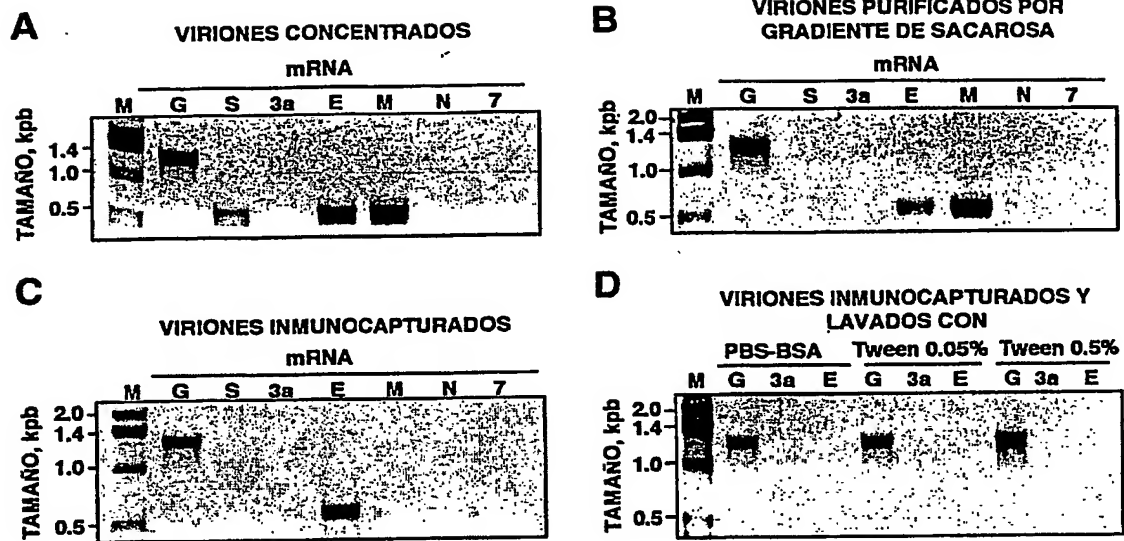
FIGURA 7

FIGURA 8

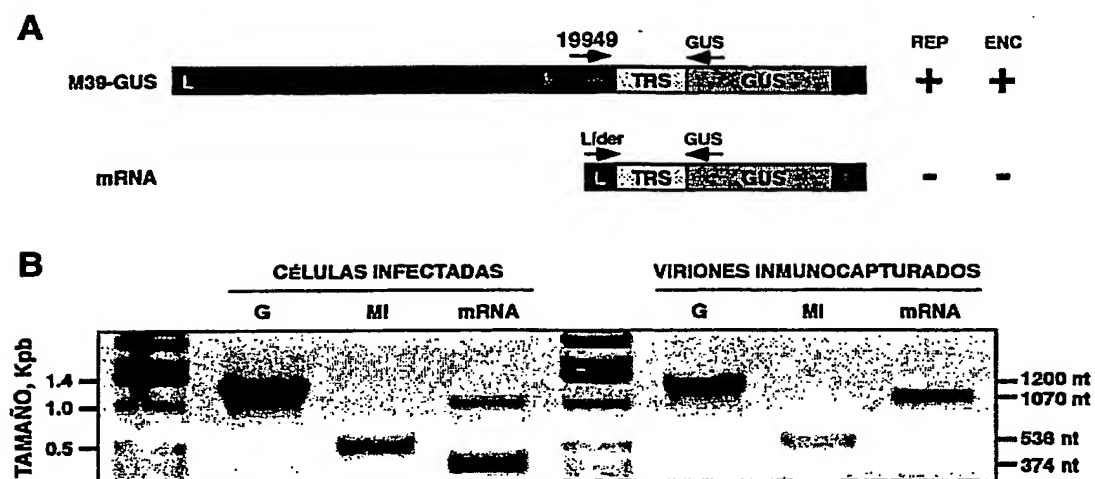


FIGURA 9

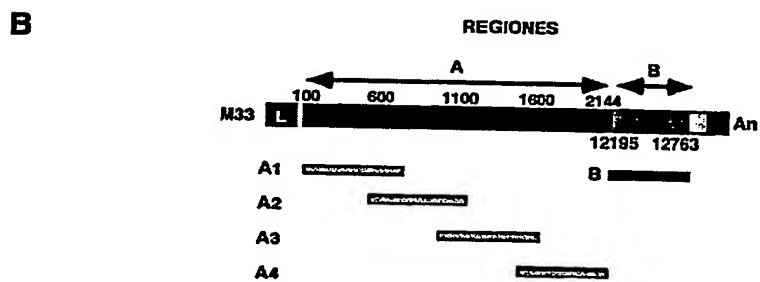
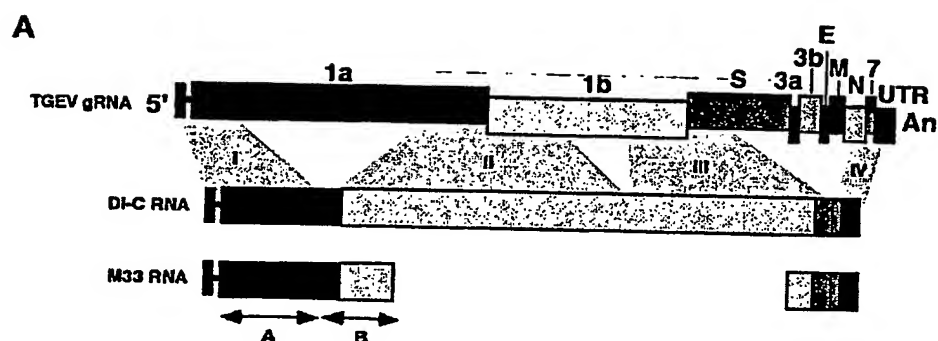


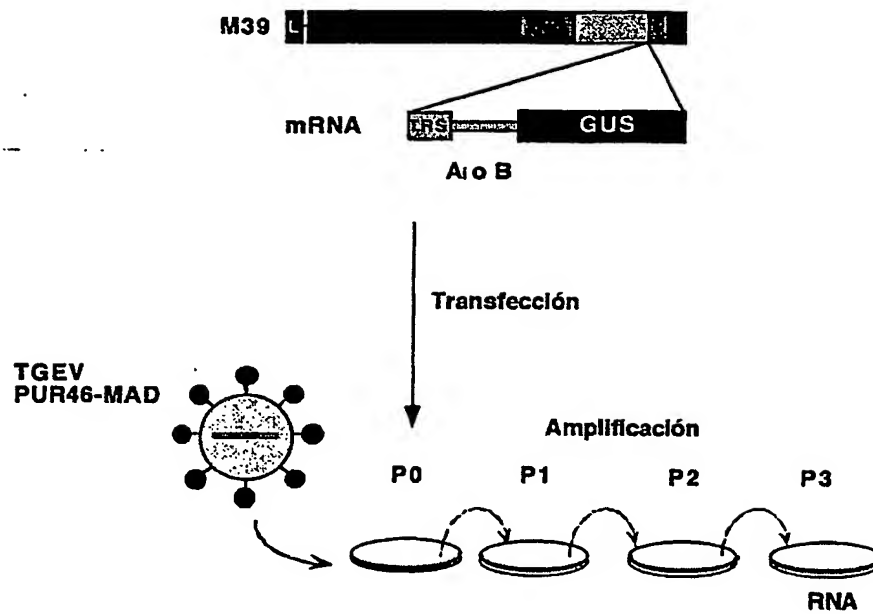
FIGURA 10

FIGURA 11

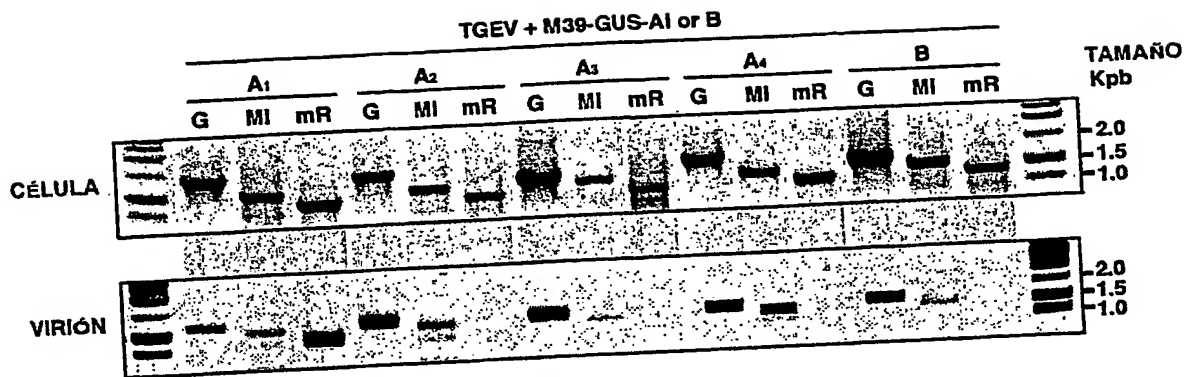


FIGURA 12

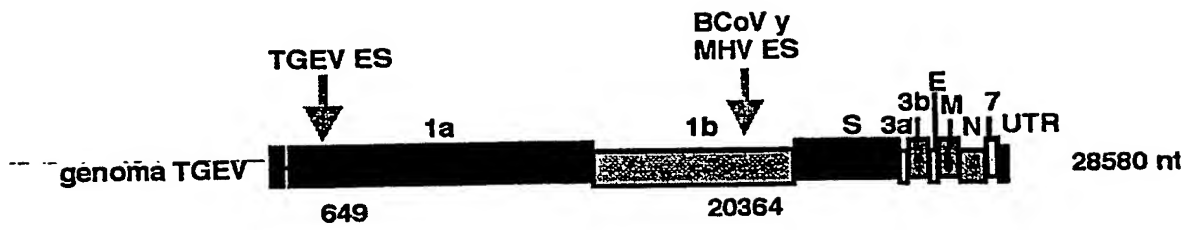
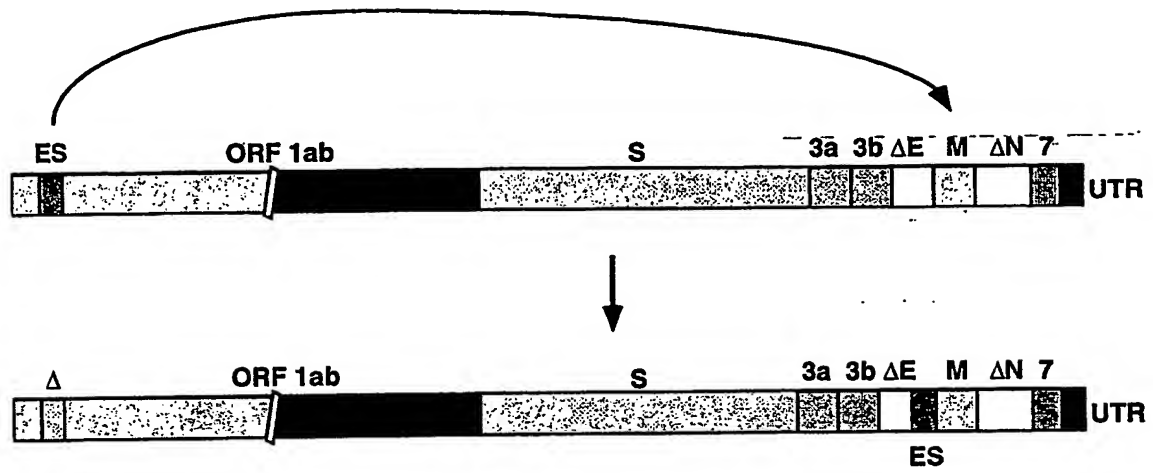


FIGURA 13



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.